

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号  
特開2001-226371  
(P2001-226371A)

(43) 公開日 平成13年8月21日 (2001.8.21)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テマコード* (参考)
C 0 7 D 319/24		C 0 7 D 319/24	
G 0 1 N 33/53		G 0 1 N 33/53	G

審査請求 未請求 請求項の数 3 O L (全 7 頁)

(21) 出願番号 特願2000-39914(P2000-39914)

(22) 出願日 平成12年2月17日 (2000.2.17)

(71) 出願人 000206956

大塚製薬株式会社

東京都千代田区神田司町2丁目9番地

(72) 発明者 矢内原 昇

静岡県静岡市北403番地の22

(72) 発明者 小平 司

徳島県板野郡松茂町広島字南川向56-7

(74) 代理人 100065215

弁理士 三枝 英二 (外8名)

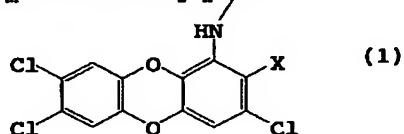
(54) 【発明の名称】 ダイオキシン誘導体およびこれを使用した測定法

(57) 【要約】

【課題】 免疫測定法本来の利点を保持したダイオキシン類の高感度な測定・検出技術およびこれに用いる標識体を提供する。

【解決手段】 一般式 (1) :

【化1】



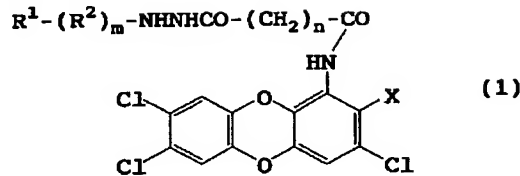
(式中、Xは水素原子または塩素原子を、R<sup>1</sup>はビオチン残基を、R<sup>2</sup>は同一または相異なってアルギニン残基またはリジン残基を、nは1~5の整数を、またmは1~3の整数を、それぞれ示す)で表わされるビオチン化ダイオキシン誘導体、および該誘導体を標識体として利用することを特徴とするダイオキシン類の免疫測定法。

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】一般式(1)：

【化1】



(式中、Xは水素原子または塩素原子を、R<sup>1</sup>はビオチン残基を、R<sup>2</sup>は同一または相異なってアルギニン残基またはリジン残基を、nは1～5の整数を、またmは1～3の整数を、それぞれ示す)で表わされるビオチン化ダイオキシン誘導体。

【請求項2】Xが水素原子、nが4およびmが2である請求項1に記載の一般式(1)で表わされる誘導体。

【請求項3】請求項1に記載のビオチン化ダイオキシン誘導体を標識体として利用することを特徴とする、ダイオキシン類の免疫測定法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、ダイオキシン類、特に2, 3, 7, 8-テトラクロロジベンゾ-p-ダイオキシン(以下「2,3,7,8-TCDD」という)の改良された免疫測定法、および該測定法に利用する新規なビオチン化ダイオキシン誘導体に関する。

【0002】

【従来の技術】ダイオキシン類とは、ポリ塩化ジベンゾ-p-ダイオキシン類(polychlorinated dibenzo-p-dioxins: PCDDs)およびその類似物質であるポリ塩化ベンゾフラン類(polychlorinated dibenzofurans: PCDFs)の総称であり、塩素原子の位置と数により多くの異性体が存在している。これは、含塩素有機化合物の焼却などにより工場、焼却炉から排出し、大気、河川、土壤に拡散される。

【0003】このダイオキシン類が注目されたのは、その毒性であり、特に2, 3, 7, 8-TCDDは毒性が高く、ヒト、家畜、家禽の臓器、生理機能などに悪影響を及ぼし、これが国内、国外を問わず大きな社会問題となっている。

【0004】従来より、ダイオキシン類の検出・測定は、このような含塩素有機化合物の場合に一般的である高速液体クロマトグラフィー、GC-マススペクトロスコピー、LC-マススペクトロスコピーなどの物理化学的機器を使用した方法により実施されている。しかしながら、このような方法は、用いられる機器類が高価であるばかりでなく、検体(サンプル)量、検体の処理能力にも限界があり、これに代わる、より簡便でしかも多数の検体を正確且つ迅速に測定・検出できる方法の開発が望まれていた。

2

【0005】一方、免疫測定法は、一般に、測定の時間短縮化、簡便化、低コスト化および多数検体の同時処理などの多くの利点があり、ダイオキシン類の検出・測定においてもかかる免疫測定法の応用が考えられ、当該測定系に利用される特異抗体の作成やそれらを利用した測定系の開発が試行されてきている(Toxicology, 45, 229-243 (1987); Anal. Chem., 70, 1092-1099 (1998); 米国特許4238472号明細書; 同5429925号明細書; 同5674697号明細書; 特開昭63-14691号公報; 同63-74494号公報など参照)。

【0006】しかしながら、これらの測定系は、被検試料に極めて低濃度に存在するダイオキシン類の特異的な測定・検出法としては、尚充分ではなく、斯界においては、ダイオキシン類のより高感度な免疫測定法の確立、提供が望まれている(The Science of the Total Environment, 239, 1-18 (1999))。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、上記従来技術の課題を解決したダイオキシン類の高感度な免疫測定法を提供することを目的とする。より詳しくは、本発明は、免疫測定法本来の上述した利点は保持したままで、斯界で望まれているダイオキシン類をより高感度で測定・検出できる改良された方法およびこれに用いられる標識体を提供することをその主要な目的とする。

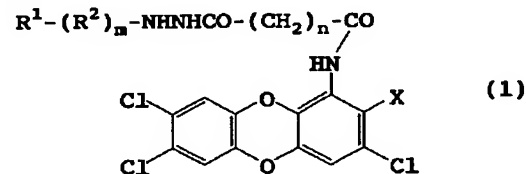
【0008】

【課題を解決するための手段】本発明者は、鋭意研究を重ねた結果、下記一般式(1)で表わされる新規なビオチン化ダイオキシン誘導体が、上記目的に合致するダイオキシン類の免疫測定系における標識体として有用であることを見出した。また、本発明者は、かかる誘導体の利用によって、実際に、従来技術に比してより高感度でダイオキシン類の測定・検出を行ない得る測定系を確立するに成功した。本発明は、かかる新知見を基礎として完成されたものである。

【0009】本発明によれば、一般式(1)：

【0010】

【化2】



【0011】(式中、Xは水素原子または塩素原子を、R<sup>1</sup>はビオチン残基を、R<sup>2</sup>は同一または相異なってアルギニン残基またはリジン残基を、nは1～5の整数を、またmは1～3の整数を、それぞれ示す。)で表わされるビオチン化ダイオキシン誘導体、特に、Xが水素原子、nが4およびmが2である上記誘導体が提供される。

【0012】また、本発明によれば、上記ビオチン化ダイオキシソ誘導体を標識体として利用することと特徴とする、ダイオキシソ類の免疫測定法が提供される。

【0013】

【発明の実施の形態】本発明のビオチン化ダイオキシソ誘導体は、免疫測定系の液相に可溶性である（水溶性である）ことによって特徴付けられる。従って、これはダイオキシソ類の免疫測定系における標識体として極めて有用である。

【0014】ビオチンは、ビオチン／アビジンの特異結合を利用した間接標識剤として慣用されており、また一般の酵素類と比較して、低分子（分子量244.31）であることより、免疫測定系における標識体としての利用が好ましいものの、それ自体水溶性に欠けており、水溶性に欠けるダイオキシソとの結合体は、当然に水不溶性であるため上記免疫測定系には採用することができない。

【0015】これに対して、本発明のビオチン化ダイオキシソ誘導体は、ダイオキシソ類の免疫測定法への利用に適した水溶性を具備しており、しかも抗ダイオキシソ抗体との交差反応性を消失しないものであり、これらの点より、斯界で要望されるダイオキシソ類の免疫測定系への利用に適したものである。

【0016】本発明測定法の好ましい1態様は、後述するとおりであり、例えば、この好ましい1態様としての酵素免疫測定法によれば、約0.1～100ng/mLの範囲のダイオキシソ類が測定可能である。この濃度範囲は、例えばヒト尿および血漿中におけるダイオキシソ類の濃度に相当する。即ち、本発明は、かかるヒト尿などを検体として、その中のダイオキシソ類を測定できる、非常に高感度な測定系を提供するものである。

【0017】本発明のビオチン化ダイオキシソ誘導体は、ダイオキシソ類、例えばその毒性がよく知られている、2, 3, 7, 8-TCDDを代表とする7種のポリ塩化ジベンゾ-p-ダイオキシソおよび／または2, 3, 7, 8-トリクロロジベンゾフランを代表とする10種のポリ塩化ジベンゾフランの任意の各種免疫測定法における標識体として有用であり、殊に、2, 3, 7, 8-TCDDを測定対象として含むダイオキシソ類の免疫測定法に好ましく利用することができる。

【0018】また、一般式(1)中、Xが水素原子である本発明のビオチン化ダイオキシソ誘導体は、毒性が極めて低く、従ってかかる誘導体を利用する本発明測定法は、その操作中の安全性が高く保たれる利点もある。

【0019】以下、本発明ビオチン化ダイオキシソ誘導体につき詳述すれば、該誘導体は、前記一般式(1)で表わされる。

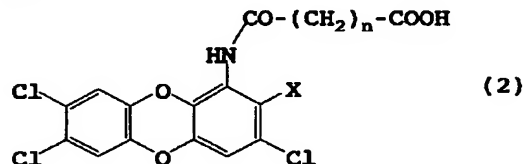
【0020】但し、該一般式(1)において、R<sup>1</sup>で示されるビオチン残基とR<sup>2</sup>で示されるアミノ酸残基(R<sup>1</sup>基と直接結合する基)との結合は、ビオチンのカルボキ

シル基とアミノ酸のアミノ基とのアミド結合であるものとする。また、R<sup>2</sup>で示されるアミノ酸残基(ArgおよびLys)は、特に断らない限り、D体およびL体の両者を包含するものとする。

【0021】本発明ビオチン化ダイオキシソ誘導体は、例えば、下記一般式(2)で示される化合物のヒドラジドと、一般式(3)で示される化合物との縮合反応により製造することができる。

【0022】

【化3】



【0023】(式中、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、X、mおよびnは前記に同じ。)

ここで一般式(3)の化合物は、通常の液相法および固相法を包含する一般的なペプチド化学合成法に従い、例えば、ビオチンおよび所望のアミノ酸の1種を、または2種以上を順次、縮合反応させることにより製造することができる。該合成法において、採用される縮合反応も、公知の各種縮合反応に従うことができる。

【0024】該合成法に採用される縮合反応方法としては、例えば、アジド法、混合酸無水物法、DCC法、活性エステル法、酸化還元法、DPPA（ジフェニルホスホリルアジド）法、DCC+添加物（1-ヒドロキシベンゾトリアゾール、N-ヒドロキシスクシニアミド、N-ヒドロキシ-5-ノルボルネン-2, 3-ジカルボキシイミドなど）、ウッドワード法などを例示できる。

【0025】これら各方法に利用される溶媒も、この種のペプチド縮合反応に慣用される各種の溶媒から適宜選択することができる。その例としては、例えばN-メチルピロリドン（NMP）、ジメチルホルムアミド（DMF）、ジメチルスルホキシド（DMSO）などおよびこれらの混合溶媒などを例示できる。

【0026】尚、上記縮合反応において、反応に関与しない官能基は、常法に従い、通常の保護基により保護でき、これらは反応終了後に脱離できる。これら各反応方法は公知であり、それらに用いられる試薬類も公知のものから適宜選択できる。

【0027】例えば、アミノ基の保護基としては、ベンシルオキシカルボニル、第三級ブトキシカルボニル（Boc）、イソボルニルオキシカルボニル、p-メトキシベンジルオキシカルボニルなどを例示できる。また、カルボキシ基の保護基としては、例えばメチルエステ

ル、エチルエステル、第三級ブチルエステルなどの低級アルキルエステルやベンジルエステルやp-メトキシベンジルエステルなどを形成し得る基を例示することができる。

【0028】アルギニンのグアニジノ基の保護基としては、例えば2, 2, 5, 7, 8-ペンタメチルクロモン-6-スルホニル(Pmc)、2, 2, 4, 6, 7-ペンタメチルジヒドロベンゾフラン-5-スルホニル(Pbf)、ニトロ、ベンジルオキシカルボニル、Boc、p-トルエンスルホニルなどを例示できる。

【0029】これら保護基の脱離反応もまた慣用される方法、例えば、接触還元法や、液体アンモニア/ナトリウム、フッ化水素、臭化水素素、塩化水素、トルフルオロ酢酸(TFA)、酢酸、メタンスルホン酸などを用いる方法などに従い実施できる。

【0030】一般式(2)の化合物のヒドラジドは、例えばBoc、ベンジルオキシカルボニル、Troccなどの任意の保護基で保護されたヒドラジンと一般式(2)の化合物とを、上記と同様に縮合反応させ、次いで得られる化合物の保護基を脱離反応させることにより製造することができる。

【0031】かくして得られる一般式(2)の化合物のヒドラジドと一般式(3)の化合物の縮合反応も、上記した縮合反応に準じて実施することができ、保護基の導入と脱離も同様にして行うことができる。

【0032】尚、一般式(2)の化合物は、公知の方法(Toxicology and Applied pharmacology, 50, 137-146 (1979)など)に従い容易に製造することができる。

【0033】かくして得られる本発明の一般式(1)で表わされるビオチン化ダイオキシン誘導体は、常法に従い、高速液体クロマトグラフィーなどの各種の精製手段により適宜その精製を行うことができる。

【0034】本発明のビオチン化ダイオキシン誘導体の利用によれば、通常の免疫測定法、例えば酵素免疫アッセイ(EIA)や酵素免疫メトリックアッセイ(ELISA)などの各種免疫分析方法に従って、ダイオキシン類、特に2, 3, 7, 8-TCDDの特異的且つ高感度な測定・検出が可能である。

【0035】かかる本発明の免疫測定法は、本発明のビオチン化ダイオキシン誘導体を測定系の標識体として利用することを必須とし、それ以外は、通常の各種免疫分析方法に従い実施することができる。

【0036】測定系の抗ダイオキシン抗体は、所望により、各種の任意の固相に固定化して用いることができる。当該固相としては、この種の技術分野において慣用の各種の固相が利用できる。該固相への抗体の固定化も、特に制限はなく、通常の物理的結合および化学的結合のいずれによっても実施することができる。

【0037】免疫反応も特に制限はなく、通常の免疫測定法で採用されている条件、例えば、一般には45℃以

下、通常約4~40℃にて約0.5から数時間程度の条件下に実施することができる。また、反応に使用される溶媒およびそのpHも当該反応に悪影響を与えないものであれば、特に制限されない。その例としては、例えばクエン酸緩衝液、リン酸緩衝液、トリス塩緩衝液、酢酸緩衝液などを挙げることができる。

【0038】本発明測定法は、好適には、本発明標識体を用いる競合法に従い実施することができる。例えば、抗ダイオキシン抗体を固相化してなる固相化抗体に、標識体としての本発明誘導体の存在下に、測定対象のダイオキシン類を含み得る検体を加えて、抗原抗体反応(競合)を行わせる。次いで、固相化抗体に結合した標識体を通常のアビジンからなる検出試薬を用いて測定する。

【0039】ここでアビジンからなる検出試薬としては、特に制限されることなく一般に当業界で採用されている各種の標識剤で修飾されたアビジン或いはストレプトアビジンを広く用いることができる。アビジンの標識剤としては、特に制限されず、従来公知のものまたは将来使用され得るいずれのものをも用いることができる。具体的には、アルカリフォスファターゼ(ALP)やペルオキシダーゼ(HRP)などの酵素類を好ましいものとして例示することができる。これら標識剤によるアビジンの修飾は、自体公知の方法に従って実施できる。また、これらの修飾体は、市販品としても入手できる。

【0040】尚、標準抗原(スタンダード)としては、前記一般式(2)で表される化合物が利用でき、特に該式中、Xが水素原子およびnが4である化合物が好ましいものとして例示できる。

【0041】本発明に係わるダイオキシン類の特異的測定・検出法の特に好ましい1例としては、後述する実施例に記載の高感度ELISAを例示することができる。

【0042】尚、本発明に係わるダイオキシン類の測定・検出に際しては、本発明ビオチン化ダイオキシン誘導体を有効成分として含有する測定キットを利用するのが簡便である。かかるキットには、当該誘導体に加えて、前記したアビジンからなる検出試薬、抗ダイオキシン抗体、標準抗原およびアッセイ緩衝液などの、当該測定・検出を実施するのに際して必要な、任意の他の試薬をさらに包含させることができる。

【0043】本発明に係わるダイオキシン類の測定法は、被検物質としてのヒトおよび動物中の、即ちヒトおよび動物の組織、血液、尿、骨髓液、唾液および魚類の組織および血液中の、ダイオキシン類の測定乃至検出に有効な手段を与えるものであり、外因性物質の生体刺激・分泌機構或いは臓器組織への影響の解明・研究に役立つものである。

【0044】また、本発明方法は、河川、海水、排水、大気、土壌などを被検物質として、これら環境中のダイオキシン類の測定・検出にも有用である。

【0045】尚、本発明測定法に利用される抗ダイオキ

シン抗体は、測定対象であるダイオキシン類に特異反応性を有するものであれば、特に制限はなく、これらは前記した各種公知の抗体或いはそれらに準じて製造した抗体であることができる。該抗体には、温血動物の抗血清や鶏卵抗体などのポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体が含有される。

【0046】当該抗体は、測定対象とするダイオキシン類に応じて適宜選択することができる。好ましくは、2, 3, 7, 8-TCDDと反応性を有する抗体であることができる。

【0047】また、ダイオキシン類のような低分子有機化合物を抗原として産生する抗体の力価においては、一般に、ポリクローナル抗体が優れていることが本発明者により確認されており、本発明でもかかるポリクローナル抗体の利用をより好ましいものとして例示することができる。

【0048】かかる抗体は、免疫抗原を温血動物（ヒトを除く）に免疫することにより収得できる。その方法ないし手法は、基本的には常法に従うことができる。

【0049】上記において免疫抗原としては、好ましくは前記一般式（2）で表される化合物のキャリア蛋白結合体であることができる。

【0050】上記キャリア蛋白としては、抗原またはハプテンの免疫原性を高めるものとして当該分野で慣用の各種キャリア蛋白、例えばアルブミン、グロブリン、チオグロブリン、ヘモシアニンなどの各種動物蛋白質やポリリジンなどを制限なく採用できる。これらキャリア蛋白質は、前記した縮合反応と同様にして、慣用の試薬を用いた縮合反応により、一般式（2）の化合物との結合体とすることができる。

【0051】かくして得られるキャリア蛋白結合体は、それ自体所望の免疫原性を有し、本発明測定法に良好に採用し得る特異抗体製造用の免疫抗原として使用できる。

【0052】尚、かかる免疫抗原は、所望により、上記キャリア蛋白結合体を高分子吸着体に吸着させて得られる吸着体として使用することもできる。

【0053】ここで、高分子吸着体としては、免疫原性を高めるものとして、当該分野で慣用される各種高分子物質を採用することができ、例えば、ポリビニルピロリドン、ラテックス、ブタチオグロブリンなどの血清蛋白質および炭素末などを例示できる。該高分子吸着体と上記キャリア蛋白結合体とを常法に従い混和することにより所望の吸着体が得られる。

【0054】上記免疫抗原を用いた免疫化および所望の抗体の取得操作も、常法に従うことができる。例えば、ポリクローナル抗体の製造は、ウサギ、ヒツジ、モルモット、ニワトリのような温血動物に、上記免疫抗原を、通常、フロイントの完全アジュバントと混和して調製した乳化物を、複数回注射免疫し、得られる抗血清を常法

に従い取得することにより実施できる。また、ニワトリの場合には、上記免疫抗原を複数回免疫して、該ニワトリが産卵する鶏卵にイムノグロブリン（IgY）を産生させ、そして該鶏卵の卵黄より、常法に従いIgYを取得することによっても、所望のポリクローナル抗体を得ることができる。

【0055】またかかる抗体は、勿論モノクローナル抗体として取得することもできる。該モノクローナル抗体は、例えば上記免疫抗原をフロイントの完全アジュバントとともにマウスに複数回投与して免疫化し、抗体を産生させるとともに、例えば細胞融合法などの常法に従い、得られる抗体産生細胞と骨髓脾細胞とを融合し、クローニングし、目的とする抗体を産生する単一クローン細胞を分離し、該細胞の培養により取得することができる。

【0056】かくして得られる抗体は、所望により、硫酸塩析、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィーなどの常法に従いさらに精製することができる。

20 【0057】

【実施例】以下、実施例により本発明をさらに詳細に説明する。しかし、これらの実施例は非制限的なものであり、本発明の範囲はそれらの例によって限定解釈されるべきものではない。

#### 実施例1

後記参考例で得た一般式（2）の化合物（X=水素原子、n=4）を出発原料として用いて、本発明のバイオチン化ダイオキシン誘導体を製造した。

30 【0058】即ち、水溶性カルボジイミド（3.8 μL；ペプチド研）を、上記化合物（2.3 mg、5.4 μmol）およびBoc-N<sub>2</sub>H<sub>3</sub>（1.4 mg、10.7 μmol）のジメチルホルムアミド溶液（1.0 mL）にて-10℃にて添加し、室温にて18時間攪拌した。反応混合物に氷冷下に蒸留水を加え固化した固化物を集め減圧乾燥して、1位側鎖が Boc-NH<sub>2</sub>CO(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CONH- の3, 7, 8-トリクロロジベンゾ-p-ダイオキシン2.5 mgを得た。

40 【0059】これをトリクロロ酢酸（TFA）（0.5 mL）に溶解し、室温で40分間攪拌して脱Boc化後、後記参考例で得たバイオチン- $\text{L-Arg(pbf)-L-Arg(pbf)-OH}$ （7.3 mg、6.8 μmol）と、DMF（1.0 mL）中、上記と同様に水溶性カルボジイミド/1-ヒドロキシベンゾトリアズール（WSCl/HOBt）法で室温2日間縮合した。

50 【0060】反応混合物に、氷冷化、蒸留水を加えて固化し、固化物を集めて減圧下に乾燥した。この5.0 mgを、蒸留水（65 μL）およびトリイソプロピルシラン（65 μL）を含むTFA（2.4 mL）に溶解し、室温で2時間攪拌後、ジエチルエーテルを加えて固化、乾燥して、目的の粗生成物4.5 mgを得た。

【0061】この粗生成物(4.5mg)を10%酢酸(1mL)に溶解後、0.1%TFA/アセトニトリル混合溶媒の直線濃度勾配(85/15→20/80,30分)による分取用逆相HPLCにて精製して、目的の化合物(一般式(1)の化合物: X=水素原子、m=2、n=4、R<sup>2</sup>=L-Arg)0.2mgを得た。

【0062】マスマスペクトルにて、理論値(分子量:983.378)に一致するピークを確認した。

#### 実施例2

##### ① 抗体固定化プレートの作成

96ウェルのマイクロプレート(Maxi Sorp Nunc)の各ウェルに、0.1Mクエン酸緩衝液で200倍に希釈したヤギ抗ウサギIgG血清(Jackson Immuno Research)をそれぞれ100μLずつ分注した。25℃で2時間静置後、上清を捨て、ブロックエース(大日本製薬)を各ウェルに340μL分注して25℃2時間静置した。洗浄液(0.1%Tween 20を含む0.15M NaCl)で5回洗浄後、0.01MPBS緩衝液(0.05%BSA, 0.05%Tween 20, 10mM EDTA含有)で1000倍に希釈した抗ダイオキシシン抗体(後記参考例で得た抗体調製物)を各ウェルに100μLずつ分注した。4℃で24時間静置し、抗ダイオキシシン抗体が固相化された抗体固相化プレートを得た。

##### ② 標準液の調整

参考例で得た一般式(2)の化合物(X=水素原子、n=4)の1mgをヘキサメチレンスルフォラミド(Hexamethylphosphoramide)またはDMSOに溶解後、PBS緩衝液にて1000倍に希釈し、濃度1μg/mLの標準液とした。さらにこの溶液について5倍希釈の操作を行い、200;40;8;1.6;0.32;0.064μg/mLの標準希釈液をそれぞれ調製した。

##### ③ 標識体の調製

実施例1で得た本発明化合物(一般式(1)の化合物: X=水素原子、m=2、n=4、R<sup>2</sup>=L-Arg)の200μgを0.1N酢酸に溶解し、使用時にPBS緩衝液で1000倍に希釈して使用した。

##### ④ 発色液の調整

ストレプトアビジン-HRP(CALBIOCHEM)の200μgをPBS緩衝液で2000倍に希釈して使用した。

【0063】また、発色剤には、0.015%過酸化水素を含む0.1Mリン酸ナトリウム-クエン酸緩衝液(pH5.0)10mLにOPD錠(10mg:Sigma)を溶解し、最終濃度1mg/mLになるように使用時に調製した。

##### ⑤ 免疫測定

抗ダイオキシシン抗体を固定化したプレートの各ウェルを洗浄後、各段階希釈の標準品50μLまたは測定すべき検体50μLを加えた。さらに上記の標識体50μLを

添加し、マイクロタイタープレートを密封して室温にて2時間反応させた。その各ウェルの液を流し除いて5回洗浄操作を繰り返した。

【0064】各ウェルに上記で調製した発色液を100μLずつ注入し、室温で15分間反応させた。その後、各ウェルに酵素反応停止液として2N硫酸100μLを加え、マイクロタイタープレート用吸光度計を用いて、波長490nmにて各ウェル内の液の吸光度をそれぞれ測定した。

10 【0065】かくして得られた標準曲線を図1に示す。

##### 参考例1

1-アミノ-3,7,8-トリクロロジベンゾ-p-ダイオキシシン(30.0mg,0.1mmol)を4-ジメチルアミノピリジン(6.1mg,0.05mmol)を含む無水ピリジン溶液(2.0mL)に溶解した。

20 【0066】アジピン酸モノメチルエステル(74.1μL,0.5mmol)を無水ピリジン溶液(2.0mL)に溶解し、塩化チオニル(360μL,5mmol)を滴下して窒素雰囲気下に5時間還流後、溶媒を留去し乾燥した。

【0067】この酸クロリドを無水ピリジン(1.0mL)に溶解し、上記1-アミノ-3,7,8-トリクロロジベンゾ-p-ダイオキシシンのピリジン溶液に加え、室温で3日間攪拌した。溶媒を留去後、エーテルを加え固化し、沈殿を集めて目的のメチルアジボイル誘導体を得た(14.0mg/31.5%)。

30 【0068】この14.0mg(31.5μmol)を95%エタノール(5.0mL)に懸濁し、0.1N NaOH(378μL,378μmol)を加え70℃にて4時間攪拌した。0~4℃に冷却後、1N HClを加え、酢酸エチルで2回抽出した。酢酸エチル層を1N HCl、ついで飽和食塩水でそれぞれ3回洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、濾過した後、溶媒を留去した。残渣をジオキサン存在下凍結乾燥して10.0mg(73.5%)の目的物(一般式(2)の化合物: X=水素原子、n=4)を得た。純度はHPLCにて98%以上であることを確認した。

##### 参考例2

40 ビオチニル-Arg(Pbf)-Arg(Pbf)-OHは、常法の固相合成法に従い合成した即ち、H-Arg(Pbf)-Trt(2-CL)-樹脂1.0g(0.49mmol)をDMFで洗浄後、HATU試薬(0.75g,1.96mmol)を用いて、Fmoc-Arg(Pbf)-OH(1.27g,1.96mmol)を縮合した。ペプチド樹脂を50%ピペリジンのDMF溶液(10mL)で室温20分間処理して脱Fmoc後、同様にしてビオチン(0.48g,1.96mmol)を縮合した。ペプチド樹脂を、酢酸:トリフロロエタノール:ジクロロメタン=1:2:7(25m

1)で室温1時間処理してペプチドを樹脂から脱離した。樹脂をろ過にて除去し、ろ液を留去して残渣にエーテルを加えて固化し沈澱物として目的化合物540mgを得た。

HATU: 0-(7-azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate

#### 参考例3

参考例1で得た化合物をハブテンとして、常法に従い、キーホール・リンベット・ヘモシアニン(KLH; Pierce)と縮合させ免疫用コンジュゲートを作成した。

【0069】即ち、上記化合物の5.2mgを20%イソプロパノール含有リン酸緩衝液1mLに溶解し、0.1M PBS (pH6.0) 2mLに溶解したKLH (20mg)と混合し、水溶性カルボジイミド(100mg: ペプチド研)を添加して、室温で30分間反応させた。

【0070】上記反応液(3mL)を50%ポリビニルピロリドン(3mL: Merck)と混和し、これを3等分し、さらにそれぞれ等量のプロイントの完全アジュバント(1mL: Calbiochem)を加えて乳化した。この乳化物を、家兎3匹(日本ホワイト、オス、体重2.0~2.5kg)に免疫抗原が0.3mg/家兎になるように調整して皮内注射した。追加免疫を初回の注射量の1/2の投与量にて2週間毎に6回注射免疫 \*

＊を繰り返すことにより行った。最終免疫1週間後、家兎の血液を全採血し、これを37℃にて1時間、その後4℃にて一夜放置し、3,000rpmで遠心分離することにより十分な力価の抗血清を収得した。これは凍結乾燥して保存した。

【0071】上記で得た抗血清の力価および各種ダイオキシン類との交差反応性を検討した結果、免疫した3匹の家兎のいずれから得られた抗血清もダイオキシン類と特異的な反応性を示した。

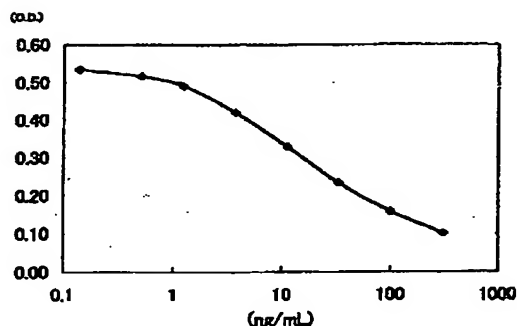
10 【0072】また、1-アミノ-3,7,8-トリクロロジベンゾ-p-ダイオキシンまたは1-アミノ-2,3,7,8-テトラクロロジベンゾ-p-ダイオキシンをカラム(FMP活性化セルロファイン: 生化学工業)に結合し、このカラムを用いて上記で得た抗血清のアフィニティークロマトグラフィーを行った。

【0073】上記アフィニティークロマトグラフィー(1M酢酸で溶出)により、3,7,8-トリクロロジベンゾ-p-ダイオキシンおよび/または2,3,7,8-テトラクロロジベンゾ-p-ダイオキシンに特異的な反応性をもち、ジベンゾ-p-ダイオキシンおよび含クロロフェノールとは実質的に交差反応しないことで特徴付けられる抗体調製物を収得した。

【図面の簡単な説明】

【図1】実施例2の⑤に従い作成された本発明免疫測定法における標準曲線である。

【図1】



THIS PAGE BLANK (USPTO)